

〈資料〉

## レチノール結合蛋白-4

渭原 博

### Retinol-binding protein-4

Hiroshi Ihara

**Summary** Retinol-binding protein (RBP) is one of the members of the lipocalin family, which binds and transports retinol (vitamin A). Recent studies revealed that RBP has several isoforms; cellular RBP-1, -2 and -3, and plasma RBP-4 (also traditionally known as "RBP"). Cellular RBPs have a role in the intercellular transport of retinoids (i.e., retinol, retinal and retinoic acid). Plasma RBP-4 is synthesized mostly in liver, but little in adipose tissue (especially, in visceral fat). Because plasma RBP-4 of liver origin is measured as a marker of nutritional status and that of adipose tissue origin as a marker of insulin resistance, we overviewed the assay methods for both plasma RBPs of liver and adipose tissue origin, together with their plasma concentrations observed by each method.

**Key words:** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Diabetes mellitus, GLUT4 glucose transporter

#### I. はじめに

レチノール結合蛋白 (Retinol-binding protein: RBP) は肝臓で合成される分子量21 kDaの蛋白質で、肝臓に蓄積されているビタミンA (Retinol) を結合・分泌して標的臓器 (細胞) に輸送する働きにある<sup>1)</sup>。RBPの血漿半減期は短く (Rapid turnover protein)、必須アミノ酸であるトリプトファン (食事から摂取し難い) を4分子含むので、蛋白栄養の指標として測定されている<sup>2)</sup>。RBPは免疫比濁法や免疫ネフェロメトリー法で測定されるが、近年、酵素免疫測定法

(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) を用いたRBP-4の測定報告が散見される。RBPのアイソフォーム (細胞内RBP-2、細胞内RBP-1、細胞内RBP-3、血漿RBP-4) について詳述する。

#### II. 細胞内RBP-2

ビタミンAは動物性食品ではレチニルエステルとして存在する。植物性食品ではプロビタミンである $\beta$ -カロチンとして存在する。いずれも脂肪に溶けて存在する。食事から小腸絨毛に入ったレチニルエステルは水解されレチノールと

東邦大学医療センター大橋病院臨床検査部  
〒153-8515 東京都目黒区大橋2-17-6

受領日 平成23年9月9日  
受理日 平成23年9月13日

Department of Laboratory Medicine, Toho University  
Ohashi Medical Center,  
2-17-6 Ohashi, Meguro, Tokyo 153-8515, Japan

なる。 $\beta$ -カロチンは2分子のレチナール(Retinal)となる。小腸粘膜の細胞質に存在する細胞内RBP-2は、レチノールまたレチナールを結合して、レチノールの再エステル化やレチナールのレチノール変換(次いで、レチニルエステルに変換される)を補助する。レチニルエステルはカイロミクロンのコアに取り込まれ、リンパに入り肝臓に輸送される<sup>1)</sup>。

細胞内RBP-2の働きは、脂溶性のレチノールを蛋白結合により可溶性にして小腸細胞内輸送、そしてレチノール代謝酵素の基質にすること<sup>3)</sup>、またレチノールの細胞毒性(毒性は不確か)を防ぐことにある。細胞内RBP-2は、CRBP II型(Cellular RBP-2: CRBP2)と表記される。細胞質に存在することから、Cytosolic RBP-2とも表記される。CRBP2は、レチノールとレチナールをリガンドとして結合し、成人では小腸粘膜にのみ特異的に発現する<sup>4)</sup>。

### Ⅲ. 細胞内RBP-1

リンパより大循環に入ったカイロミクロン(レムナント)は、レムナント受容体(アポE受容体)に結合してレチニルエステルを肝臓に輸送する。肝細胞内でのレチノールの輸送に働くのが細胞内RBP-1である。CRBP I型(Cellular RBP-1: CRBP1)と表記される。CRBP1は殆どすべての臓器に発現しており<sup>4)</sup>、レチノールをリガンドとする。すなわち、肝臓に輸送されたレチニルエステルは肝実質細胞で水解されレチノールとなる。レチノールはCRBP1と結合して星細胞に輸送される。ついで肝臓で発現・産生されるRBP-4と結合して肝外へ分泌され、標的臓器に輸送される(血中でトランスサイレチンと複合体を形成する)。標的臓器の必要量を超える余剰分は肝臓(RBP-4受容体、ついでCRBP1と結合)に戻り、再エステル化の後、レチニルエステルとして蓄積される<sup>3)</sup>(このことが血漿RBPの半減期がトランスサイレチンの半減期とならない理由である)。成人では半年分の必要量に相当するビタミンAが肝臓に蓄積される。

すなわち、RBP-4は標的臓器(細胞)のRBP-4受容体に結合してCRBP1にレチノールを受け渡す(レチノールとの親和性は、RBP-4に比べ、CRBP1が高い)。CRBP1と結合したレチノール

(ホロ型)がレチノール代謝酵素の基質となる<sup>3)</sup>。ホロCRBP1のレチノールは視細胞ではレチナールに変換されロドプシンと結合する。他の標的臓器(細胞)では、レチノイン酸に変換後、核内レチノイン酸受容体と結合して転写調節が行われる。細胞内にはレチナール輸送蛋白(Cellular retinal-binding protein: CRALBP)、レチノイン酸輸送蛋白(Cellular retinoic acid-binding protein: CRABP)が存在する<sup>4)</sup>。

### Ⅳ. 細胞内RBP-3

CRBP III型(Cellular RBP-3: CRBP3)と表記される。レチノールとレチノイン酸をリガンドとする。胎児や移植(再生肝)や肝細胞癌で発現が認められる<sup>4)</sup>。

### Ⅴ. 血漿RBP-4

RBP-4は肝臓また脂肪細胞で産生されるRBPで、血液(血漿)中に分泌されることからPlasma RBP (PRBP)とも表記される。RBPはリポカリンであり疎水性分子(脂溶性ビタミンであるレチノール)を結合・輸送する働きにある。肝臓由来のRBP-4は、これまで"RBP"として知られており、蛋白栄養の評価に用いられている。免疫比濁法や免疫ネフェロメトリー法で血漿(血清)濃度が測定されている。

レチノールは分子量が286.5 Daにあり、21 kDaのRBPに結合・輸送される。糸球体ろ過を受け尿中に排泄される。分子量55 kDaのトランスサイレチン(別名、プレアルブミン)と結合(1モル: 1モル: 1モル結合)したホロRBPは尿中へ排泄されない(トランスサイレチンはホロRBPに結合し、アポRBPとは結合できない)。血中に分泌されたホロRBP(トランスサイレチン複合体)は、標的臓器(細胞)のRBP-4受容体を介してCRBP1にレチノールを受け渡しアポRBPとなる。そしてアポRBPはトランスサイレチン(半減期2日)から乖離する。アポRBPは糸球体濾過を受けるが、一部分は近位尿管で再吸収される(腎プロテアーゼにより、蛋白部分は分解されアミノ酸として再利用される)<sup>1)</sup>。トランスサイレチンは最大2分子のRBPを結合できるが、血漿中では1分子のRBPとの結合にあり、

RBPとサイロキシンの結合部位は別である。ホロRBPと結合するトランスサイレチンのサイロキシン結合については、ホロRBPトランスサイレチン複合体の分子サイズが80 kDaであることや構造解析にサイロキシンが認められないことから、サイロキシンとの結合は否定的である<sup>5)</sup>。

ホロRBPの血中半減期は16時間と短く、Rapid turnover proteinとして蛋白栄養の指標に用いられている（アポRBPの半減期は3.5時間）。成人男性の血清（血漿）濃度の基準値は3.6～7.2 mg/dL、成人女性の基準値は2.2～5.3 mg/dLにある<sup>2)</sup>。近年、RBP-4をインスリン抵抗性の指標とする報告が散見される。RBP-4は肝臓また脂肪細胞で産生されるが、脂肪細胞の発現量が高い（これまでの研究に血漿中のRBPのオリジンについて分画した報告は見当たらない）。最近の研究では、肥満者（また2型糖尿病）ではインスリン抵抗性を示し、脂肪組織（内臓脂肪）のGlucose transporter 4（GLUT4：細胞外グルコースを細胞内に輸送・取り込む働きを持つ）の発現が減少し、同時に血漿RBP-4濃度の増加（細胞内のRBP-4のmRNAの発現増加）が認められている（脂肪組織のレチノール代謝は肝臓と同じ機構と考えられ、脂肪組織にレチノールの体内蓄積総量の20%がある）<sup>6)</sup>。

RBP-4はレチノイン酸による核内受容体への関与（仮説）<sup>6)</sup>を介して、糖新生にかかわる酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）の発現を誘導する。その結果、インスリン作用が抑制され、さらにトランスロケーションの抑制が起こる。トランスロケ

ーションとは、GLUT4がインスリンの存在（あるいは運動時）により細胞の内側から表面（細胞膜上）に移動して、グルコースを細胞内に取り込み、グリコーゲンに代謝する働きにある。インスリンがないとGLUT4のトランスロケーションは起こらず、グルコースの細胞内への取り込みが妨げられる（耐糖能の低下）。別の仮説<sup>6)</sup>では、脂肪細胞で産生されるRBP-4が何かしらの糖尿病発症因子（インスリン感受性を低下させる脂溶性物質）を有し、この因子をRBP-4が血中輸送を介して肝臓や骨格筋に転送するとも考えられている。脂肪細胞でGLUT4の発現が低下する理由については明確な結論は見出せていない。

この様なメカニズムにより肥満者でインスリン感受性の低下が惹起されるが、肝臓や骨格筋のGLUT4の発現量に低下は認められない<sup>6)</sup>。内臓脂肪で産生されたホロRBPトランスサイレチン複合体が肝臓、骨格筋に輸送されると、肝臓や骨格筋でのGLUT4のトランスロケーションに抑制が起こる。レチノイド類の経口投与（フェンレチニド<sup>6)</sup>やフコキシサンチン<sup>7)</sup>）により脂肪細胞に蓄積されるレチノールを置換すると、分泌されるホロRBP-4はトランスサイレチンと結合できず、RBP-4の尿中排泄が増加しインスリン感受性が高まるという。血清RBP濃度を正常化することによりインスリン抵抗性および耐糖能を改善できる可能性が提唱されている。このために血清RBP-4の測定が注目されているが、血清（血漿）RBP-4のELISAによる報告値<sup>8-13)</sup>に、1/10～1/100の乖離例がある（表1）。

表1 報告者と血清RBP-4濃度

報告者	基準値また血清（血漿）濃度	測定ELISAキット
Ziegelmeier M, et al.	2.8 ± 0.8 mg/dL	Adipogen
Haider DG, et al.	0.27 ± 0.05 mg/dL	Phoenix Peptides
Bobbert P, et al.	0.0273 ± 0.01851 mg/dL	ALPCO Diagnostics
Aeberli I, et al.	0.918 - 3.206 mg/dL	Immun Diagnostik AG
Takebayashi K, et al.	2.06 ± 0.47 mg/dL	Phoenix Pharmaceuticals
Perseghin G, et al.	2.32 ± 0.57 mg/dL	Immun Diagnostik AG
キット説明書	2.0 - 6.0 mg/dL	CircuLex
キット説明書	2.0 - 7.0 mg/dL	Immun Diagnostik AG
キット説明書	1.27 - 4.86 mg/dL	Quantikine

幾つかの報告値は2~3 mg/dL程度にあり、従来の免疫比濁法や免疫ネフェロメトリー法での血清(血漿)RBP濃度の基準値に近似する。市販ELISAキットの説明書では2~6 mg/dLが血中濃度のようなものである。乖離の原因を考えるとELISAは高感度のために試料の希釈が求められる。希釈倍率の計算ミスも考えられるが国際誌へ掲載された論文でもあり可能性は低い。測定に用いられる抗体の反応性に原因が考えられる。ホロRBP(ホロRBP-4)はトランスサイレチンと結合して血中に存在する。測定に用いる抗体(エピトープ)が、このトランスサイレチン複合体と結合できないこと、また抗体のホロRBP-4との反応性が低くアポRBP-4だけに反応することも考えられる。測定試薬によっては血中のRBP-4(full-length RBP-4)でなく、尿中RBP-4(RBP-4 modified by carboxyl terminus-proteolysis)を抗原として抗体を作成している<sup>14)</sup>。精確な測定法には、full-length RBP-4を抗原とした抗体の作成とfull-length RBP-4を標準物質とすることが求められる。

## VI. まとめ

血清RBP-4濃度の測定には、full-length RBP-4の蛋白量を測定するウェスタンブロット法がGold standard methodとして推奨されている。日常検査で用いている免疫比濁法や免疫ネフェロメトリー法が、この基準に準拠して、さらにウェスタンブロット法の測定値とのコンピュータビリティが確認できれば、更なる有用性にあるものと考え(これまでの報告でも免疫ネフェロメトリー法を用いた測定で糖尿病患者において腎症の悪化とともに血清RBP濃度が増加(>8 mg/dL)<sup>15)</sup>することや、免疫比濁法でも尿中RBP排泄量の増加<sup>16)</sup>が示されている)。そのためには蛋白栄養の指標としての"BPP"と、インスリン抵抗性の指標としての"RBP-4"(ELISA)について同一検査とした標準化作業が必要となろう。

## 文献

- 1) 渭原博編著: ビタミンA (Vitamin A). 臨床材料を試料とする栄養の検査法 - Laboratory Tests for the Assessment of Nutritional Status -, 1-6, ヘルス・システム研究所, 東京 (2011)
- 2) 渭原博編; 斉藤憲祐: レチノール結合蛋白 (Retinol binding protein). 臨床材料を試料とする栄養の検査法 - Laboratory Tests for the Assessment of Nutritional Status -, 120-121, ヘルス・システム研究所, 東京 (2011)
- 3) 日本ビタミン学会編; 目崎喜弘: ビタミンAの代謝. ビタミン総合辞典, 13-15, 朝倉書店, 東京 (2010)
- 4) 日本ビタミン学会編; 藤木亮次, 加藤茂明: 相互作用, 受容体機能. ビタミン総合辞典, 30-33, 朝倉書店, 東京 (2010)
- 5) Newcomer ME, Ong DE: Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim Biophys Acta*, 482: 57-64, 2000.
- 6) Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB: Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, 436: 356-362, 2005.
- 7) フコキサンチン. セルメディア株式会社ホームページ (<http://www.cellmedica.ne.jp/product/fuco.html>)
- 8) Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lossner U, Kratzsch J, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Serum levels of adipokine retinol-binding protein-4 in relation to renal function. *Diabetes Care*, 30: 2588-2592, 2007.
- 9) Haider DG, Schindler K, Prager G, Bohdjalian A, Luger A, Wolzt M, Ludvik B: Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 1168-1171, 2007.
- 10) Bobbert P, Weithäuser A, Andres J, Bobbert T, Kühl U, Schultheiss HP, Rauch U, Skurk C: Increased plasma retinol binding protein 4 levels in patients with inflammatory cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*, 11:1163-1168, 2009.
- 11) Aeberli I, Biebinger R, Lehmann R, l'Allemand D, Spinass GA, Zimmermann MB: Serum retinol-binding protein 4 concentration and its ratio to serum retinol are associated with obesity and metabolic syndrome components in children. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 4359-4365, 2007.
- 12) Takebayashi K, Suetsugu M, Wakabayashi S, Aso Y, Inukai T: Retinol binding protein-4 levels and clinical features of type 2 diabetes patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 2712-2719, 2007.
- 13) Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F, Esposito A, Belloni E, Canu T, Ragogna F, Scifo P, Del Maschio A, Luzi AL: Serum Retinol-binding protein-4, leptin, and adiponectin concentrations are related to ectopic fat accumulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 4883-4888, 2007.
- 14) Graham TE, Wason CJ, Blüher M, Kahn BB.

- Shortcomings in methodology complicate measurements of serum retinol binding protein (RBP4) in insulin-resistant human subjects. *Diabetologia*, 50: 814-823, 2007.
- 15) 斎藤憲祐, 清水あゆみ, 井上早苗, 濱田千江子, 福井光峰, 富野康日己: 糖尿病性腎症患者における栄養アセスメントタンパクの効果的使用法. 日腎会誌, 46: 73-78, 2004.
- 16) 金森きよ子, 芝紀代子, 澤田久美子, 栗原由利子, 眞重文子, 坂爪実, 亀子光明, 橋本顕生: 「N-アッセイLA RBPニットーポー」を尿中レチノール結合蛋白測定に応用するための基礎的検討. 日臨検自動化会誌, 33: 876-881, 2008.